Aus dem Hygienischen Institut der Universität München

Über die Bestimmung der Keimzahl in Bakterienreinkulturen

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung der veterinär-medizinischen Doktorwürde

der

tierärztlichen Fakultät

der

Ludwig-Maximilians-Universität München

vorgelegt von

Georg Dichtl
approb. Tierarzt aus München

Druck von R. Oldenbourg in München
1919

Aus dem Hygienischen Institut der Universität München

Über die Bestimmung der Keimzahl in Bakterienreinkulturen

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung der veterinär-medizinischen Doktorwürde

der

tierärztlichen Fakultät

der

Ludwig-Maximilians-Universität München

vorgelegt von

Georg Dichtl
approb. Tierarzt aus München

Druck von R. Oldenbourg in München
1919

Gedruckt mit Genehmigung der tierärztlichen Fakultät der Universität München.

Referent: Professor Dr. Süpfle.

Bei den verschiedensten bakteriologischen Experimenten mit Reinkulturen ist es erforderlich, die Keimzahl festzustellen. Am üblichsten ist es, das Ausgangsmaterial in passender Weise zu verdünnen und abgemessene Mengen davon so auf oder in geeignete Nährböden zu verteilen, daß die ausgesäten Keime sich nach entsprechender Bebrütung zu isolierten Kolonien entwickeln; es wird dann aus der Zahl der Kolonien auf die ursprüngliche Keimzahl geschlossen.

Diese Methode hat den Nachteil, daß ihr Resultat bestenfalls am anderen Tag, ev. erst nach mehreren Tagen abgelesen werden kann.

Es ist aber oft wichtig, sofort die Keimzahl einer Bakterienaufschwemmung zu erfahren, da man bei bestimmten Versuchen mit bekannten Keimmengen arbeiten muß.

Es sind einige Verfahren publiziert, die diese Forderung erfüllen, so z. B. die mikroskopische Zählung der Bakterien, entweder nach Analogie der Blutkörperchenzählung in einer Zählkammer (Hueppe, Winterberg), oder in gefärbten Ausstrichpräparaten (Klein, Heheworth, Wright), ferner eine kolorimetrische Methode (Zelikow), bei der die Farbstoffmenge bestimmt wird, die eine Bakterienmenge aus einer bekannten Farblösung herausnimmt.

Im Hygienischen Institut der Universität München wurde bei nichtpublizierten Milzbrandversuchen die Keimzahl u. a. durch Abmessen des ausgeschleuderten Bodensatzes ermittelt, den eine Bakterienaufschwemmung beim Zentrifugieren in geeigneten Röhrchen ergibt. Es

wurde hierzu das von Trommsdorff zur Bestimmung der Leukozytenmenge in Milchproben angegebene Zentrifugenröhrchen benutzt.

Der gleiche Gedanke liegt dem Verfahren zugrunde, auf das Eugen Rosenthal[1]) i. J. 1913 aufmerksam gemacht hat; er gab hierzu ein eigenes Modell an, das etwas von dem Trommsdorffschen Röhrchen abweicht.

Unter Leitung von Herrn Prof. Dr. K. Süpfle, dem ich für seine Unterstützung ergebenst danke, habe ich Versuche darüber angestellt, inwieweit das Prinzip, aus der Menge des Zentrifugates auf die Keimzahl einer Bakterienaufschwemmung zu schließen, für die Laboratoriumspraxis brauchbar gemacht werden kann.

Meine Aufgabe war so zu lösen, daß festgestellt werden mußte, ob in Aufschwemmungen von Bakterienreinkulturen, die unter möglichst gleichen Bedingungen gezüchtet waren, jeweils dem gleichen Zentrifugat eine gleiche Menge lebender Keime in der Volumeinheit entspricht.

Der Aufgabe standen beträchtliche äußere und innere Schwierigkeiten entgegen: die technische Durchführung mußte so gestaltet werden, daß die Fehlerquellen der Arbeitsweise auf ein Minimum eingeschränkt wurden. Peinlichstes quantitatives Arbeiten konnte uns diesem Ziele nahe bringen.

Nur bis zu einem gewissen Grade waren andere Schwierigkeiten durch regulierbare Bedingungen zu umgrenzen. Bekanntlich steigt die Zahl der lebenden Keime in einer künstlichen Bakterienreinkultur im Laufe der Bebrütung bei einer bestimmten konstanten Temperatur innerhalb einer gewissen Zeit bis zum Maximum an, um dann wieder abzunehmen. In dem beschränkten Standort einer gegebenen Nährbodenmenge findet die Vermehrungsmöglichkeit der Bakterien — je nach der Intensität der Züchtungsbedingungen — früher oder später ein Ende und es erfolgt — langsam oder schnell — ein Absterben der Individuen. Wenn man die Bebrütungszeit als Abszissen, die Zahl der lebenden Individuen als Ordinaten aufträgt, kann man für diese Vorgänge in einer Bakterienreinkultur eine bestimmte „Wachstumskurve" erhalten, die je nach der Bakterienart und den Züchtungsbedingungen einen verschiedenen Verlauf zeigt.

Nach den Darlegungen von E. Gotschlich[2]) ist es sehr

1) Eugen Rosenthal, Über ein einfaches Instrument zur Bestimmung der Bakterienmenge. Berl. klin. Wochenschrift 1913, S. 1751.

2) Gotschlich, Allgemeine Morphologie und Biologie der pathogenen Mikroorganismen; im Handbuch der pathogenen Mikroorganismen, herausgegeben von Kolle und v. Wassermann.

wahrscheinlich, daß der Absterbeprozeß nicht erst mit dem Gipfel der Wachstumskurve, sondern schon während der aufsteigenden Periode beginnt, so daß die Wachstumskurve in Wirklichkeit die Differenz zwischen einer Vermehrungs- und Absterbekurve darstellen würde.

Die Zahl der Keime in einer Reinkultur wird also niemals völlig identisch sein mit der Zahl der lebenden Keime — wir müssen in der Volumeinheit Bakterien neben lebenden Keimen immer eine Anzahl toter Individuen erwarten — um so mehr tote, je länger ceteris paribus die Bebrütung gedauert hat.

Ja, selbst alle lebenden Keime werden wir nicht in ihrer Gesamtheit restlos als lebend erkennen.

Jede Zählung der lebenden Keime mittels Aussaat auf feste Nährböden geht von zwei Voraussetzungen aus: 1. jede Kolonie verdankt einem Keim ihre Entstehung — nur einem Keim; in Wirklichkeit sind es nicht immer Einzelindividuen, sondern — seltener oder häufiger — Wuchsverbände, aus denen Kolonien werden; 2. jedes lebensfähige Individuum bildet eine Kolonie; in Wirklichkeit entstehen Kolonien nur aus den Keimen, die unter den Bedingungen der Aussaat in den gewählten Nährböden vermehrungsfähig sind, d. h. die so resistent sind, daß sie die Shokwirkungen aushalten, die mit den hierbei nötigen Prozeduren verbunden sind.

Entsprechend diesen Überlegungen mußten wir darauf gefaßt sein, daß auch nach möglichster Ausschaltung aller technischen Fehlerquellen die Bestimmung des Sedimentvolumens nur ein schätzungsweises Urteil auf die Zahl der lebenden Keime erlaube.

Wenn es aber gelingen sollte, das Verfahren so auszubilden, daß wenigstens innerhalb bestimmter und bekannter Grenzen eine Kongruenz zwischen Sedimentvolumen und Keimzahl festzustellen ist — dann wäre eine Methode gefunden, die infolge ihrer Einfachheit und Schnelligkeit willkommen wäre.

Arbeitsweise.

Ehe wir uns entschlossen, die Keimzählung nach dem Koch schen Plattenverfahren durchzuführen, habe ich Versuche über die Genauigkeit einer anderen Methode angestellt.

Mittels einer Öse wurde die passend verdünnte Bakteriensuspension auf die Oberfläche erstarrten Agars ausgestrichen. Um das Konfluieren der Kolonien zu verhüten, wurden die erstarrten Agarplatten vor der Besäung 20 Minuten im Faust-Heim schen Trocknungsapparat getrocknet. Auch nach längerer Einübung der Technik fielen aber die

Ergebnisse von Parallelversuchen nicht so zuverlässig kongruent aus, wie die von uns erstrebte Genauigkeit verlangte; in manchen Versuchen waren die Keimzahlen verschiedener Aussaaten aus der gleichen Bakteriensuspension zwar recht wenig verschieden (z. B. 443, 453, 498, 421 Keime bei 4 Parallelzählungen), andere Male aber waren die Schwankungen ohne ersichtlichen Grund erheblicher (z. B. 295, 454, 368 Keime bei 3 Parallelzählungen).

Wir entschieden uns daher zu dem K o c h schen Plattenverfahren mit Agar.

Das Ausgangsmaterial wurde so stark verdünnt, daß womöglich nie mehr als 200 bis 300 Kolonien auf einer Platte aufgingen, so daß die Zählung mit bloßem Auge vorgenommen werden konnte. Es wurde stets die gesamte Platte ausgezählt und zwar nach 24 stündiger sowie — um ein verspätetes Auskeimen nicht zu übersehen — nach 48 stündiger Bebrütung bei 37°. Um das Ausgangsmaterial passend zu verdünnen, waren meist 1 — 20 000 000-fache Verdünnungen notwendig; als Verdünnungsflüssigkeit diente nicht phys. Kochsalzlösung, da sie für verschiedene Keime bekanntlich nicht indifferent ist, sondern 10% Bouillonkochsalzlösung. Von der Verdünnung wurden 0,1 ccm in eine Petrischale gegeben und mit 41° warmem flüssigen Agar vermischt. Es gelang eine besonders gleichmäßige Verteilung und Mischung der Aussaat in der Platte dadurch, daß in die sterile Petrischale zunächst einige ccm (5—10) steriler Bouillon gebracht und mit der Petrischale im Brutschrank vorgewärmt wurden. Dann erst wurde die abgemessene Menge keimhaltiger Flüssigkeit zugegeben, gemischt und sofort Agar unter Hin- und Herbewegen der Schale hinzugefügt. Für jede Keimzählung wurden 3—4 Parallelproben angesetzt.

Um die Genauigkeit unseres Vorgehens zu prüfen, stellten wir uns von einer bestimmten Bakterienaufschwemmung bekannte Verdünnungen her, z. B. 1 : 2, 1 : 4 und machten von diesen verschiedenen Konzentrationen Keimzählungen.

Wenn wir exakt gearbeitet hatten, mußten wir Keimzahlen erhalten, die den Verdünnungen entsprachen, also z. B. 400 000000, 200 000000, 100 000 000. Diese Erwartung wurde aber anfänglich nicht erfüllt. Und zwar lag, wie sich bald herausstellte, die Schuld an der Ungenauigkeit der Pipetten, die wir zur Herstellung der Verdünnung benutzten.

Ich habe daher sämtliche Pipetten, mit denen ich arbeitete, einer Nacheichung unterzogen. Die Nachprüfung der Eichung wurde bei den 0,1 ccm-Kapillarpipetten mit Quecksilber vorgenommen, bei den Pipetten zu 1, 10 und 100 ccm mit Wasser von 15° C. Ich fand bei den Pipetten

Tabelle I.

Keimzählungen nach dem Kochschen Plattenverfahren mit ungeprüften Pipetten.

16—20stündige Agarkulturen von Micr. pyogenes (Züchtungstemperatur: 37°) werden sorgfältig mit Kochsalzlösung aufgeschwemmt; die Suspensionen werden durch Watte filtriert und sowohl in konzentriertem Zustande als auch nach Verdünnung 1 : 2 als Ausgangsmaterial zur Zählung benutzt.

Die angegebenen Zahlen bedeuten die Zahl der Kolonien, die in Agar nach Züchtung bei 37° aufgingen, wenn 0,1 ccm der Verdünnung 1 : 10 000 000 mit 41° warmem Agar zu Platten ausgegossen wurde.

Datum des Versuchs	Bakterien-Suspension: konzentriert		Bakterien-Suspension: verdünnt 1 : 2		Gegenseitige prozentuale Abweichung: der Kolonienzahl der einzelnen Platten vom arithmetischen Mittel der Parallelversuche: konzentriert	Gegenseitige prozentuale Abweichung: der Kolonienzahl der einzelnen Platten vom arithmetischen Mittel der Parallelversuche: verdünnt 1 ; 2	Gegenseitige prozentuale Abweichung: der arithmetischen Mittel der Parallelversuche voneinander
		arithmetisches Mittel der Parallelversuche		arithmetisches Mittel der Parallelversuche			
29. 1.	200		111		+ 2,6	— 6	
	190	195	130	118	— 2,6	+ 10,2	+ 21,1
	195		114		—	— 3,4	
31. 1.	260	260	123	117	—	+ 5,1	— 10,01
			111			— 5,1	
1. 2.	273		174		+ 6,2	+ 8,1	
	231	257	137	161	−10,1	— 14,9	+ 25,4
	267		172		+ 3,9	+ 6,8	
4. 2.	127	132	283	273	— 3,8	+ 3,7	— 3,3
	137		260		+ 3,8	— 4,8	
			278			+ 1,9	
5. 2.	72	70	204	219	+ 2,9	+ 6,9	— 35,9
	71		222		+ 1,4	+ 1,4	
	69		219		— 1,4	—	
			229			+ 4,6	

relativ bedeutende Fehler, bei den 0,1 ccm-Kapillarpipetten Fehler bis zu —10%. Ich möchte übrigens bemerken, daß ich nur Pipetten mit nicht ausgeteilter Spitze benutzte.

Im einzelnen wurden die Verdünnungen gewöhnlich so hergestellt, daß 0,1 ccm der Bakteriensuspension (in Kochsalzlösung aufgeschwemmte Agarkulturen), deren Keimzahl bestimmt werden sollte, zunächst mit 100 ccm Verdünnungsflüssigkeit (10% Bouillon-Kochsalzlösung) vermischt wurde; von dieser Verdünnung wurde nach sorgfältigem Mischen 0,1 ccm entnommen und zu 100 ccm Verdünnungsflüssigkeit gesetzt. Die so erzielte Verdünnung 1 : 1 000 000 wurde nötigenfalls bis zu 1 : 10 000 000 oder 1 : 20 000 000 weiter verdünnt.

Tabelle II.

Keimzählungen nach dem Kochschen Plattenverfahren mit exakt nachgeeichten Pipetten.

Die Versuche sind genau in derselben Weise durchgeführt wie die in Tabelle I beschriebenen, nur dienten zu den Verdünnungen und zur Aussaat exakt nachgeeichte Pipetten.

Datum des Versuchs	Bakterien-Suspension				Gegenseitige prozentuale Abweichung		
	konzentriert		verdünnt 1 : 2		der Kolonienzahl der einzelnen Platten vom arithmetischen Mittel der Parallelversuche		der arithmetischen Mittel der Parallelversuche voneinander
		arithmetisches Mittel der Parallel-Versuche		arithmetisches Mittel des Parallelversuchs	konzentriert	verdünnt 1 : 2	
18. 2.	390	441	205	196	— 11,7	+ 4,6	— 11,02
	385		204		— 12,88	+ 4,1	
	500		181		+ 13,6	— 7,7	
	488		195		+ 10,8	— 0,5	
21. 2.	130	133	61	67	— 2,3	— 8,9	+ 0,75
	137		67		+ 3,0	—	
	131		64		— 1,5	— 4,5	
			74			+ 10,4	
25. 2.	262	259	121	132	+ 1,17	— 8,4	+ 1,9
	242		131		— 6,6	— 0,76	
	273		139		+ 5,5	+ 4,56	
			139			+ 3,32	
27. 2.	106	125	62	59	— 15,2	+ 5,1	— 5,6
	130		62		+ 4,0	+ 5,1	
	127		52		+ 1,6	— 11,8	
	139		60		+ 11,2	+ 1,69	
28. 2.	256	233	120	126	— 9,9	— 4,7	+ 8,17
	218		122		— 6,5	— 3,2	
	227		126		— 2,6	—	
	231		139		— 0,9	+ 10,3	
3. 3.	163	159	79	78	+ 2,5	— 1,28	— 1,89
	155		95		— 2,5	+ 21,8	
	147		72		— 4,6	— 7,7	
	172		64		+ 8,2	— 17,9	

Seitdem ich mit exakt nachgeeichten Pfpetten arbeitete, fielen meine Keimzählungen regelmäßig und wesentlich genauer aus. Tabelle I gibt meine Zählversuche wieder, die mit ungeprüften Pipetten angestellt wurden, Tabelle II solche Versuche, zu denen nachgeeichte Pipetten dienten.

Um die Ergebnisse der Parallelzählungen in den einzelnen Versuchen miteinander vergleichen und in ihrer Genauigkeit beurteilen zu können, rechnete ich die gegenseitigen Abweichungen der Kolonienzahlen der einzelnen Platten vom arithmetischen Mittel der zusammengehörigen Parallelzählungen in Prozenten aus. Ein Vergleich der beiden Tabellen I und II zeigt deutlich den Einfluß der Nacheichung der Pipetten auf die Genauigkeit der Resultate.

Berechnet man die Mittelzahl aus den prozentualen Abweichungen bei den Versuchen mit ungeprüften Pipetten, so erhält man bei 5 Beobachtungen die Zahl $\pm$ 19,14%. Die entsprechende Mittelzahl bei den 6 Versuchen mit nachgeeichten Pipetten beträgt $\pm$ 4,88%.

Bei unserem Vorgehen beträgt der Gesamtfehler bei der Keimzählung nach dem Kochschen Plattenverfahren also etwa $\pm$ 5%, während Neißer [1]) bei dieser Methode mit durchschnittlichen Fehlern von 33% rechnet.

Nunmehr konnten wir daran gehen, das Sedimentvolumen einer Bakterienaufschwemmung mit der Zahl der lebenden Keime zu vergleichen.

Zur Bestimmung der Sedimentmenge standen zwei Instrumente zur Verfügung: das Trommsdorffsche und das Rosenthalsche Modell. Beides sind umgebildete Zentrifugengläser, deren Spitze in eine Glaskapillare endet.

Die Kapillare des Trommsdorffröhrchens ist unten zugeschmolzen; eine in cbmm eingeteilte Skala gestattet die Ablesung des Sedimentvolumens bis zur Menge von 20 cbmm. Die Kapillare ist weit genug, um die Desinfektion und Reinigung ohne besondere Schwierigkeiten zu ermöglichen.

Die Kapillare des Rosenthalröhrchens ist enger und länger. Die Skala gibt nicht cbmm an, sondern halbe mm und zwar 50 halbe mm. Das Volumen des Zentrifugates, das sich in der Kapillare absetzt, ist also aus der Höhe und dem Durchmesser der Kapillare (1 mm) nach der Formel $r^2\pi \cdot h$ erst zu berechnen.

Nicht ganz einfach ist die Wiederinstandsetzung des Rosenthalröhrchens nach der Benutzung. Da die Kapillare sehr eng ist, kann sie nur dann desinfiziert und gereinigt werden, wenn sie am unteren Ende zu öffnen ist. Rosenthal hat bei seinem Modell daher die Kapillare unten offen gelassen und als Verschluß eine abschraubbare Kapsel vorgesehen;

1) Neißer, Qualitatives und quantitatives Arbeiten in der Bakteriologie (Bakterienzählung); im Handbuch der Hygiene, herausgegeben von M. Rubner, M. v. Gruber und M. Ficker.

nach seiner Gebrauchsanweisung gibt man in die Kapsel so viel Quecksilber, daß es beim Anschrauben bis zu einem Skalenteil emporsteigt.

Die Kapseln, die ich benutzte, schlossen jedoch sämtlich so schlecht, daß das Quecksilber während des Zentrifugierens stets aus der Kapillare verschwand, weil es zwischen Kapsel und äußere Glaswand der Kapillare eindrang.

Es mußte daher ein anderer abnehmbarer Verschluß geschaffen werden. Wir verfuhren folgendermaßen: das Rosenthalröhrchen wurde an seinem ausgezogenen Ende bis zum Beginne der Skala abgeschliffen. Soll das Röhrchen verschlossen werden, so bringt man am Ende der Kapillare eine Kappe an, die jedesmal so hergestellt wird, daß zunächst ein Blättchen Guttapercha an das vorher etwas erhitzte Kapillarende angedrückt wird; sodann taucht man dieses in passend erwärmten Flaschenlack (die Konsistenz muß gerade zähflüssig sein) und sorgt, während man das umgestürzte Gläschen zeitweise dreht, für langsame Erstarrung. So entsteht ein Abschluß, der, vorausgesetzt, daß die Flaschenlackkappe eine gewisse Stärke besitzt und auch die Außenwand der Kapillare etwas umfaßt, stärkstes Zentrifugieren aushält. Durch das Guttaperchablättchen wird eine vollkommen plane Fläche für die darauf ruhende Bakteriensäule geschaffen, so daß das Ablesen ohne Fehler möglich ist. Die Entfernung des Verschlusses bereitet keine Schwierigkeiten.

Zur Desinfektion und Reinigung wird durch die Kapillare Desinfektionsflüssigkeit, später Wasser mittels einer Wasserstrahlluftpumpe hindurchgesaugt.

Das Rosenthalröhrchen ist also zwar umständlicher zu handhaben als das Trommsdorffröhrchen, gestattet aber wegen seiner feineren Eichung ein genaueres Ablesen. Außerdem ist auch die Form des Rosenthalröhrchens für unseren Zweck geeigneter, da es ganz allmählich in die Kapillare übergeht, während das Trommsdorffröhrchen an der Übergangsstelle des weiteren Teiles in den engeren einen ziemlich scharfen Knick hat, was das Absetzen des Zentrifugates erschwert.

Um ein genaues Arbeiten zu ermöglichen, erwies es sich als erforderlich, beide Röhrchen nachzueichen. Dabei kamen nicht unerhebliche Fehler, besonders in den höheren Teilen der Skalen, zum Vorschein. Die Nacheichung erfolgte mit Quecksilber, und zwar für jeden einzelnen Skalenteil.

Damit im Zentrifugenröhrchen alle Bakterien der zu untersuchenden Probe als Sediment niedergeschleudert werden, muß die Zentrifuge eine ausreichende Geschwindigkeit besitzen. Eine Wasserzentrifuge mit 2000 Umdrehungen in der Minute war nicht imstande, innerhalb einer Stunde aus 0,1 ccm Bakterienaufschwemmung alle Bakterien auszu-

schleudern. Dagegen lieferte eine elektrisch betriebene Zentrifuge mit 3000 Umdrehungen in der Minute (von Lautenschläger) nach 30—40 Minuten langem Zentrifugieren befriedigende Resultate; das Sediment aus 0,1 ccm Aufschwemmung einer Agarkultur in Kochsalzlösung hatte ein konstantes Volumen angenommen, das unverändert blieb, wenn zur Kontrolle die Zentrifugierdauer verlängert wurde.

Daß die Ausschleuderung der Bakterien recht vollständig gelang, dafür sprach das makroskopisch völlig klare Aussehen der überstehenden Flüssigkeit.

Allerdings mußte die Bakterienaufschwemmung aus Bakterien bestehen, die auf Agar gezüchtet waren. Bouillonkulturen ließen sich nicht klar zentrifugieren, auch nach mehrmaligem vorausgegangenen Auswaschen mit Kochsalzlösung nicht. Immerhin war auch bei den Versuchen mit Agarbakterien anzunehmen, daß ein gewisser Rest der Bakterien nicht sedimentiert werde. Um über die Größe dieses Restes Klarheit zu verschaffen, wurde die Keimzahl einer Bakterienaufschwemmung durch Gießen von Agarplatten bestimmt. Darauf wurden 0,1 ccm der gleichen Aufschwemmungen im Rosenthalröhrchen 35—40 Minuten zentrifugiert. Nach Ablauf dieser Zeit wurde die Zahl der lebenden Bakterien in der über dem Zentrifugat stehenden Flüssigkeit festgestellt. Zu diesem Zweck nahm man mit einer geeichten Platinöse von der überstehenden Flüssigkeit, ohne zu schütteln, ein bestimmtes Quantum (9 mg) heraus und verdünnte dieses mit so viel Bouillonkochsalzlösung, daß eine Verdünnung 1:1000 resultierte. Von dieser Verdünnung stellte man eine Verd. 1:100000 her, und säte davon 0,1 ccm auf Agar aus.

Nach Ablauf von 24 Stunden konnte man auf Grund der auf dem Agar entstandenen Kolonien und unter Berücksichtigung des Verdünnungsgrades die Zahl lebender Keime in 0,1 ccm nicht zentrifugierter und in 0,1 ccm zentrifugierter Flüssigkeit bestimmen.

Die Zahlen, die ich für die beiden zu meinen Versuchen benutzten Bakterienarten (Mäusetyphusbazillen und Staphyl. pyog. aureus) bekam, sind in Spalte 2 und 3 der Tabelle III zusammengestellt. In Spalte 4 ist die Zahl der lebenden Keime in der zentrifugierten Bakterienaufschwemmung in Beziehung gesetzt zur Zahl der lebenden Keime in der nicht zentrifugierten Bakterienaufschwemmung und so das prozentuale Verhältnis der nichtzentrifugierten Keime berechnet.

Aus der Tabelle III ist zu ersehen, daß der Fehler, der beim Zentrifugieren einer Aufschwemmung von Agarkulturen durch Zurückbleiben von Keimen in der über dem Zentrifugat stehenden Flüssigkeit resultiert, höchstens 0,1% beträgt; er kann also vernachlässigt werden.

Tabelle III.

Bestimmung der beim Centrifugieren einer Bakterienaufschwemmung nicht ausgeschleuderten Keimmenge.

Bakterienart	Zahl der lebenden Keime in 0,1 ccm nicht zentrifugierter Bakterien-Aufschwemmung	Zahl der lebenden Keime in 0,1 ccm zentrifugierter Bakterien-Aufschw.	Prozentzahl der nicht-zentrifugierten Keime.
Mäusetyphusbaz, (51 stünd. Agar-Kultur gezüchtet bei 22° C).	Millionen 2280	Millionen 2,4	0,1
do.	1380	1,4	0,1
Staphylococcus pyog. aur. ($92^1/_2$ stünd. Agar-Kultur gezüchtet bei 22° C.) . .	2820	2,1	0,074
do.	2640	1,1	0,041
Staphylococcus pyog. aur. (67 stünd. Agar-Kultur gezüchtet bei 22° C.) . . .	2880	1,4	0,05
do.	2640	2,7	0,1

Ergebnisse.

Mit der beschriebenen Methodik suchte ich festzustellen, innerhalb welcher Grenzen aus dem Sedimentvolumen einer Aufschwemmung von Agarbakterien ein Schluß auf die Zahl der lebenden Keime der Volumeneinheit Bakterienaufschwemmung zulässig ist.

Die Versuche erstreckten sich auf Micrococcus pyogenes und Bacterium typhi murium. Die Herstellung der Bakteriensuspensionen erfolgte so, daß die auf Agarplatten gewachsenen Vegetationsmassen mittels phys. Kochsalzlösung unter Zuhilfenahme eines sterilen Glasspatels sorgfältig aufgeschwemmt wurden; die Aufschwemmungen wurden, um etwaige Bakterienklümpchen zurückzuhalten, durch sterile Watte filtriert. Die Aufschwemmungen waren dicht.

Von dieser Aufschwemmung wurden jeweils einerseits 0,1 ccm im Trommsdorff- oder Rosenthalröhrchen zentrifugiert, anderseits 0,1 ccm unter entsprechender Verdünnung zu Agar-Zählplatten verarbeitet.

Wir untersuchten zunächst, ob der Wassergehalt des Agarnährbodens, auf dem die Versuchsbakterien gewachsen waren, einen erkennbaren Einfluß auf die Beziehungen zwischen Sedimentvolumen und Zahl lebender Keime habe. Es könnte sein, daß die Bakterien (A), die auf wasserreicherem Agar gewachsen sind, ein größeres Volumen haben als die auf trockenem Agar gewachsenen (B); bei gleichen Sedimentvolumen wäre dann bei

A-Bakterien eine kleinere Zahl lebender Keime zu erwarten, als bei B-Bakterien.

Die Oberfläche frischgegossener Agarplatten wurde teils in diesem Zustand, teils nach vorausgegangener Trocknung beimpft. Zur Trocknung wurden die Agarplatten 20 Minuten dem ca. 35—40° warmen Luftstrom im Faust-Heimschen Trocknungsapparat ausgesetzt.

Unabhängig von der Bebrütungsdauer und -temperatur, die verschieden gewählt wurden, entwickelte sich auf den „feuchten" Agarplatten ein feuchter, schmieriger Belag, während die Vegetationsmassen auf dem „trockenen" Agar auffällig glanzlos und trocken aussahen.

Der Wassergehalt hatte aber keinen nachweisbaren Einfluß auf die Zahl der lebenden Keime im Sedimentvolumen, wie Tabelle IV erkennen läßt.

Um in Tabelle IV einen Vergleich zwischen den einzelnen Versuchen zu ermöglichen, wurde die Keimzahl, wie sie in 0,1 ccm einer Probe gefunden wurde (3. Spalte), umgerechnet auf den Wert, den die Probe hätte, wenn ihr Sedimentvolumen 1 cbmm betrüge (5. Spalte). Wenn man die Zahlenwerte bei gleichaltrigen Kulturen vergleicht, so ist es in einigen Versuchen so, daß auf 1 cbmm Zentrifugat mehr Keime von „trockenem"

Tabelle IV.

Sedimentvolumen und Zahl lebender Keime bei Staphylococcus pyog. aur. nach Züchtung auf feuchter und auf trockener Agaroberfläche.

Züchtungstemperatur	Alter der Kulturen (in Stunden)	Zahl der Keime in 0,1 ccm Bakterien-Aufschwemmung (in Millionen)		Zentrifugat von 0,1 ccm der konzentrifug. Bakt.-Aufschw. (in cbmm)	Zahl der Keime umgerechnet auf 1 cbmm Zentrifugat. (in Millionen)
37°	$7^1/_2$	feucht	2146	4	537
		trocken	2380	5	476
37°	$16^1/_2$	feucht	5120	6,7	764
		trocken	6030	6,5	928
22°	27	feucht	1273	2,0	637
		trocken	2433	2,8	869
22°	37	feucht	3020	2,6	1162
		trocken	4005	3,3	1214
22°	50	feucht	2203	1,9	1159
		trocken	2847	2,7	1054
22°	52	feucht	2800	2,04	1373
		trocken	2790	2,4	1163
22°	68	feucht	3916	4,5	870
		trocken	2896	2,9	999

Agar treffen als von „feuchtem"; aber in anderen Versuchen ist es umgekehrt. Auch sind die Unterschiede in den Zahlen ziemlich unbedeutend.

Wenn wir überdies in Rechnung ziehen, daß bei diesen Versuchen, um große Ausschläge zu erhalten, die Unterschiede in dem Trockenheitsgrad des Agars absichtlich groß gewählt wurden, werden wir zu dem Schluß kommen, daß wir bei unseren Untersuchungen den — doch nur in minimalen Grenzen — schwankenden Wassergehalt der Agaroberfläche nicht als irgendwie erhebliche Fehlerquelle einzuschätzen haben.

Dagegen war vorauszusehen, daß zwei andere Außeneinflüsse große Bedeutung für unsere Frage haben:

1. die Dauer der Bebrütung der Versuchsbakterien,
2. der Temperaturgrad der Bebrütung.

Wir haben daher diesen Einflüssen von Anfang systematisch Beachtung geschenkt und folgendes festgestellt (vgl. Tabelle V—VII):

Tabelle V.

Sedimentvolumen und Zahl lebender Keime bei Micrococcus pyogenes nach verschieden langer Züchtung bei 37° C.

	Datum des Versuches	Alter der Kulturen in Stunden	Zahl der Keime (in Mill.) in 0,1 ccm der Bakterien-Aufschwemmung. (Die Zahlen sind das arithmetische Mittel aus je 3—4 Einzelzählungen.)	Zentrifugatvolumen von 0,1 ccm der Bakt.-Aufschw. (in cbmm)	Zahl der Keime (in Mill.) umgerechnet auf 1 cbmm Zentrifugat	Arithmetisches Mittel der Zahl der Keime (in Mill.) in 1 cbmm Zentrifugat für jede Gruppe	Prozentuale Abweichung der einzelnen Keimzahlen vom arithmetischen Mittel f. jede Gruppe
I. Gruppe	27. 2.	$5^1/_2$	1255	2,9	433	537	**— 19,36**
	27. 2.	$5^1/_2$	590	1,4	421		— 21,6
	3. 3.	6	3386	4,7	678		**+ 26,25**
	3. 3.	6	1550	2,3	674		+ 25,51
	5. 3.	$7^1/_2$	2146	4	537		0
	5. 3.	$7^1/_2$	2380	5	476		— 11,36
II. Gruppe	25. 2.	14	2590	2,9	893	830	+ 7,59
	25. 2.	14	1325	1,4	946		+ 13,97
	18. 2.	14	4410	4	1103		**+ 32,89**
	18. 2.	14	1960	2	980		+ 18,07
	21. 2.	15	665	1,3	512		— 38,31
	21. 2.	15	1327	2,6	510		**— 38,55**
	7. 3.	$16^1/_2$	5120	6,8	753		— 9,27
	7. 3.	$16^1/_2$	6030	6,5	928		+ 11,8
	28. 2.	21	2330	3,2	728		— 12,29
	28. 2.	21	1268	1,6	795		— 4,21
	4. 3.	$21^1/_2$	2326	2,5	930		+ 12,05
	4. 3.	$21^1/_2$	4494	5,1	881		+ 6,14
	9. 1.	44	11	6,8	1,6		

Tabelle VI.

Sedimentvolumen und Zahl lebender Keime bei Micrococcus pyog. nach verschieden langer Züchtung bei 22° C.

	Datum des Versuches	Alter der Kulturen in Stunden	Zahl der Keime (in Mill.) in 0,1 ccm der Bakterien-Aufschwemmung. (Die Zahlen sind das arithmetische Mittel aus je 3—4 Einzelzählungen).	Zentrifugatvolumen von 0,1 ccm der Bakt.-Aufschw. (in cbmm)	Zahl der Keime (in Mill.) umgerechnet auf 1 cbmm Zentrifugat	Arithmetisches Mittel der Zahl der Keime (in Mill.) in 1 cbmm Zentrifugat für jede Gruppe	Prozentuale Abweichung der einzelnen Keimzahlen vom arith. Mittel f. jede Gruppe
I. Gruppe	22. 3.	21	1303	2,04	639	766	—16,53
	11. 3.	27	1273	2	637		—16,79
	11. 3.	27	2433	2,8	869		+13,5
	12. 3.	27	1870	2,4	779		+ 1,75
	12. 3.	27	1845	2,04	904		+18,08
II. Gruppe	8. 3.	37	3020	2,6	1162	1118	+ 3,93
	8. 3.	37	4005	3,3	1214		+ 8,58
	10. 3.	50	2203	1,9	1159		+ 3,66
	10. 3.	50	2847	2,7	1054		— 5,72
	17. 3.	52	2800	2,04	1373		+22,8
	17. 3.	52	2790	2,4	1163		+ 4,02
	20. 3.	68	3916	4,5	870		—22,18
	20. 3.	68	2896	2,9	999		—10,64
	24. 3.	69	3886	3	1295		+15,83
	25. 3.	69	2260	2,12	1066		— 4,65
	27. 3.	70	3890	3,1	1255		+12,25
	18. 3.	76	2910	3,6	808		—27,72
III. Gruppe	22. 3.	89	4070	3,4	1197	1181	+ 1,35
	26. 3.	93	2600	2,04	1275		+ 7,96
	24. 3.	137	3926	3,3	1190		+ 0,76
	25. 3.	161	3326	3,06	1087		— 7,96
	26. 3.	185	2566	2,04	1258		+ 6,52
	27. 3.	209	2266	2,1	1079		— 8,64
IV. Gr.	5. 4.	238	685	1,2	571	468	+22
	29. 3.	259	860	2	430		— 8,11
	3. 4.	286	645	1,6	403		—13,88

In sehr jungen Kulturen ist die Zahl der „lebenden Individuen" in der Volumeinheit Zentrifugat geringer als in älteren Kulturen; namentlich bei Staphylokokken ist der Unterschied beträchtlich. Mit zunehmendem Alter der Kultur wird die Zahl der „lebenden Individuen" in der Volumeinheit Zentrifugat größer, bis ein Maximum erreicht ist. Von diesem Maximum ab sinkt die Zahl der „lebenden Individuen" in der Volumeinheit Zentrifugat mit der weiteren Dauer der Bebrütung.

Tabelle VII.

Sedimentvolumen und Zahl lebender Keime bei Bact. typhi murium nach verschieden langer Züchtung bei 22° C.

	Datum des Versuchs	Alter der Kulturen in Stunden	Zahl der Keime (in Mill.) in 0,1 ccm der Bakterien-Aufschwemmung. (Die Zahlen sind das arithmetische Mittel aus je 3—4 Einzelzählungen.)	Zentrifugatvolumen von 0,1 ccm der Bakt.-Aufschw. (in cbmm)	Zahl der Keime (in Mill.) umgerechnet auf 1 cbmm Zentrifugat	Arithmetisches Mittel der Zahl der Keime (in Mill.) in 1 cbmm Zentrifugat für jede Gruppe	Prozentuale Abweichung der einzelnen Keimzahlen vom arithmet. Mittel für jede Gruppe
I. Gruppe	3. 4.	22	3630	4,2	864	861	+ 0,35
	4. 4.	22	3906	4,3	908		+ 5,46
	14. 4.	23	1745	2,6	671		**— 22,06**
	14. 4.	23	2500	2,8	893		+ 3,71
	29. 3.	23	6745	6,3	1071		**+ 24,39**
	11. 4.	$23^1/_2$	2905	3,0	968		+ 12,43
	12. 4.	25	2870	3,5	820		— 4,76
	12. 4.	22	3136	3,4	922		+ 7,08
	9. 4.	27	2140	2,7	793		— 7,89
	9. 4.	28	2230	3,2	697		— 19,05
II. Gruppe	5. 4.	46	2696	3,06	881	883	— 0,23
	17. 4.	47	2530	2,8	904		+ 2,38
	17. 4.	47	2646	3,2	827		— 6,34
	31. 3.	49	2060	2,4	858		— 2,83
	23. 4.	51	3106	3,06	1015		**+ 14,9**
	23. 4.	51	1766	1,9	929		+ 5,2
	1. 4.	69	3025	3,22	939		+ 6,34
	11. 4.	69	775	0,9	861		— 2,49
	11. 4.	69	3490	3,5	997		+ 12,91
	13. 4.	70	2125	2,3	924		+ 4,64
	13. 4.	70	1840	2,3	800		— 9,39
	16. 4.	71	1675	2,1	798		— 9,62
	16. 4.	71	1775	2,3	772		**— 12,57**
	31. 3.	73	1375	1,6	859		— 2,71
III. Gr.	2. 4.	93	2295	3,5	656	630	+ 4,12
	1. 4.	94	1740	3,06	569		**— 9,68**
	2. 4.	118	1265	1,9	666		**+ 5,71**
	4. 4.	140	955	2,8	341		

Daß in alten Kulturen, entsprechend dem Absterben vieler Keime, die Zahl der lebenden Individuen pro Volumeinheit Zentrifugat kleiner ist als in jüngeren, entspricht nur der Erwartung.

Dagegen könnte es überraschen, daß in den ganz jungen Kulturen weniger Keime auf die Volumeinheit Zentrifugat treffen, als in Kulturen mittleren Alters. Vergessen wir aber nicht, daß der Sprachgebrauch

„Zahl der lebenden Individuen" eine Abkürzung ist für den ausführlichen Ausdruck „Zahl der durch das Kochsche Plattenverfahren als lebend erkennbaren Individuen". Nun befinden sich nach Reichenbach [1]) in der jungen Kultur überwiegend teilungsfähige, aber minder resistente Individuen; in den älteren Kulturen nimmt der Anteil der sich nicht mehr teilenden aber durch eine Art Reifung sich zu einer höheren Resistenz ausbildenden Individuen zu. Im Sinne dieser Anschauung wäre es also denkbar, daß bei der Zählung der Keime durch Gießen von Agarplatten bei Benutzung sehr junger Kulturen diese wenig resistenten Keime zum Teil dem Nachweis entgehen, weil manche so hinfällig sind, daß sie die Prozedur des Plattengießens nicht überleben, also keine Kolonien bilden.

Der Temperaturgrad, bei dem die Keime gezüchtet wurden, hatte folgenden Einfluß: Werden die Bakterien bei 37° kultiviert, so wird die Maximalzahl der lebenden Individuen in der Volumeinheit Sediment sehr bald erreicht; sie ist verhältnismäßig niedrig und hält sich nur kurze Zeit konstant, um dann rasch zu sinken.

Erfolgt die Züchtung jedoch bei 22°, so wird die Maximalzahl der lebenden Individuen in der Volumeinheit Sediment später erreicht; sie ist, im Vergleich zu den bei 37° gezüchteten Kulturen, nicht unwesentlich höher und bleibt relativ lange auf ihrer Höhe, ehe sie abfällt.

Das lange Konstantbleiben der Maximalzahl lebender Keime bei 22° ist wohl darauf zurückzuführen, daß die Dissimilationsprozesse des lebenden Plasmas bei 22° viel weniger rasch ablaufen als bei 37°; die Bakterien können also den Hungerzustand — der Nährboden ist ja größtenteils erschöpft, sobald die Vegetation ihre maximale Üppigkeit erlangt hat — bei der niedrigen Temperatur länger aushalten, und auch die schädigende Wirkung der eigenen Stoffwechselprodukte kommt erst später zur Geltung.

Es fragt sich nun, ob unter Berücksichtigung dieser Ergebnisse Bedingungen angegeben werden können, bei deren Einhaltung einem bestimmten Sediment eine gewisse Zahl lebender Bakterien entspricht.

Zu diesem Zweck sind in den Tabellen V—VII unsere Befunde nach Bakterienart und Temperatur sowie nach der Kultivierungsdauer gruppiert worden. Für jede Gruppe wurde für die auf 1 cbmm Zentrifugat treffenden Keimzahlen der einzelnen Versuche das arithmetische Mittel berechnet; in der letzten Spalte der Tabellen wird angegeben,

1) H. Reichenbach, Die Absterbeordnung der Bakterien und ihre Bedeutung für Theorie und Praxis der Desinfektion. Zeitschr. f. Hyg. 69 S. 171

wie groß die prozentuale Abweichung bei den einzelnen Versuchsergebnissen von diesem arithmetischen Mittel für jede Gruppe ist; die größten Abweichungen sind jeweils fett gedruckt. Dadurch läßt sich rasch ein Überblick gewinnen, bei welchem Vorgehen das Sedimentierverfahren als Zählmethode die am besten übereinstimmenden Resultate ergibt.

Beim Vergleich von Tabelle V und VI, wo Staphylokokken bei verschiedenen Temperaturen gezüchtet waren, erkennt man, daß die Resultate bei niedriger Kultivierungstemperatur günstiger sind als bei hoher.

Aus Tabelle VI geht hervor, daß die Kultivierungsdauer bei Staphylokokken am besten zwischen 90 und 200 Stunden zu wählen ist; hierbei ergeben sich nicht nur im Durchschnitt die höchsten Keimzahlen pro 1cbmm Zentrifugat, sondern auch die geringsten Abweichungen vom arithmetischen Mittel: man kann nach meinen Versuchen rechnen, daß bei diesem Vorgehen 1 cbmm Zentrifugat etwa 800 bis 1200 Millionen Staphylokokken entspricht.

Bei Mäusetyphusbazillen ist — wie Tabelle VII ergibt — für unsere Zwecke eine Züchtungsdauer von 46—73 Stunden bei 22° am geeignetsten; hier bedeutet 1 cbmm Zentrifugat etwa 600—1000 Millionen Mäusetyphusbazillen.

Auf Grund dieser Ergebnisse glaube ich, das Sedimentierungsverfahren zur Bestimmung der Keimzahl von Bakterienreinkulturen empfehlen zu können. Die Methode ist einfach und rasch zu handhaben und liefert bei exaktem Vorgehen Resultate, deren Fehler keineswegs größer, eher kleiner sind als die Fehler, die bei den bisherigen, viel zeitraubenderen Keimzahlbestimmungen als unvermeidlich angesehen werden.

Lebenslauf.

Ich, Georg Dichtl, wurde geboren am 16. Mai 1893 in München als Sohn des Staatsbeamten Adalbert Dichtl und seiner Ehefrau Walb. Dichtl. Ich besuchte bis zu meinem 10. Lebensjahr in München die Volksschule, trat dann in das humanistische Gymnasium über, auf dem ich neun Jahre lang verblieb. Sodann widmete ich mich dem tierärztlichen Studium, das ich noch im Jahre 1916 an der Universität München beendete. Im gleichen Jahre rückte ich als Unterveterinär ins Feld und wurde dort zum Veterinär d. Res. befördert.

Georg Dichtl.